

‘UJI STABILITAS ENZIM LIPASE TERIMOBILISASI PADA KITOSAN SERBUK MELALUI TEKNIK TAUT SILANG

Fandhi Adi Wardoyo¹⁾, Tri Joko Raharjo²⁾, Respati Tri Swasono³⁾

¹⁾Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang

email: fandhiadi@unimus.ac.id

^{2) 3)}Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Lipase has a great catalytic power, but easily influenced by environments and difficult to separate at the ends of the reaction, so it can not be re-used. Based on that, one solution to overcome that problem is through the enzyme immobilization. Immobilization of lipase on chitosan powder was performed via cross linking technique. Chitosan was prepared from crab shell with deacetylation degree 82,34% and crosslinked with glutaraldehyde. The aims of this research is to determine the thermal stability and multiple-use stability through the hydrolysis reaction of palm oil. Immobilized lipase on chitosan powder was able to maintain its activity at 50 °C, and still can produce free fatty acid as much as 48,55%. The immobilized lipase was also able to maintain its activity after multiple-uses up to five reaction cycles, and still can produce free fatty acid as much as 40,82%.

Keywords: lipase, immobilization, chitosan, cross linking

1. PENDAHULUAN

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia (Smith, 1997). Enzim berperan sangat penting dalam berbagai industri baik industri yang sudah modern maupun industri yang masih tradisional. Salah satu enzim yang sering digunakan adalah enzim lipase yang dapat berfungsi untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis, gliserolisis dan esterifikasi asam lemak. Enzim lipase menjalankan aktivitas katalitiknya dengan cara menurunkan energi aktivasi dan mempercepat tercapainya reaksi kesetimbangan tetapi tidak merubah titik kesetimbangan reaksi (Stryer, 1995).

Menurut Krajewska pada tahun 2004, penggunaan enzim lipase dalam bidang industri mempunyai beberapa kelemahan seperti harganya yang mahal, dibutuhkan kondisi optimum agar dapat bekerja maksimal, mudah terpengaruh lingkungan, hanya larut pada pelarut tertentu dan cenderung sulit dipisahkan di akhir reaksi sehingga tidak bisa digunakan kembali.

Pada tahun 1996 Balcao *et al* memberikan sebuah solusi untuk mengatasi kelemahan dari enzim lipase tersebut, yaitu dengan jalan imobilisasi enzim. Imobilisasi enzim adalah mengikatkan atau melekatkan

enzim secara fisik maupun kimia pada padatan pendukung (matriks pengimobil) yang tidak larut dalam air, sehingga diharapkan enzim menjadi lebih kuat, tahan terhadap perubahan kondisi reaksi sehingga dapat digunakan berulang dan dapat meningkatkan hasil reaksi.

Salah satu metode yang efektif digunakan dalam imobilisasi enzim lipase adalah metode taut silang (*cross linking*). Metode taut silang didasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antar molekul-molekul enzim oleh pereaksi sehingga menghasilkan protein tiga dimensi yang stabil. Ikatan kovalen yang terbentuk antara enzim dan padatan pendukung stabil sehingga enzim tidak mudah lepas ke dalam larutan dan substrat dapat dengan mudah berinteraksi karena enzim berada pada permukaan padatan pendukung (Brena *et al.*, 2006).

Imobilisasi enzim lipase pada kitosan melalui taut silang akan mengikat gugus -NH₂ pada enzim lipase. Sedangkan sisi aktif lipase adalah serin, histidin dan asam aspartat. Pengikatan lipase pada kitosan akan menjaga konformasi sisi aktif lipase (serin, histidin, asam aspartat) agar tidak mudah berubah akibat pengaruh lingkungan. Kestabilan enzim lipase sangat dipengaruhi temperatur. Jika temperatur terlalu tinggi

maka konformasi enzim dapat berubah drastis dan enzim dapat mengalami deaktivasi. Dengan imobilisasi enzim, konformasi enzim diharapkan tidak mudah berubah sehingga enzim tidak mudah mengalami deaktivasi. Enzim yang diimobilisasikan juga diharapkan tidak mudah lepas saat reaksi berlangsung sehingga proses pemisahan di akhir reaksi menjadi lebih mudah.

2. KAJIAN LITERATUR

Pemilihan padatan pendukung haruslah memperhatikan gugus fungsional yang berperan (Cahyaningrum, 2009). Wulan *et al.* (2009) melakukan penelitian terhadap banyaknya enzim yang terimobilisasi menggunakan berbagai padatan pendukung baik polimer organik, material anorganik, maupun garam anorganik. Hasilnya kitin memberikan enzim terimobilisasi yang lebih banyak dibanding padatan pendukung lainnya. Namun kitin reaktivitasnya cenderung lemah sehingga penggunaannya relative kurang berkembang jika dibandingkan dengan kitosan.

Febrina (2013) dan Primadevi (2013) melakukan imobilisasi enzim pada padatan pendukung kitosan *beads* untuk reaksi hidrolisis dan transesterifikasi minyak kelapa sawit. Namun adanya air dalam kitosan *beads* sedikit menghambat untuk digunakan pada substrat yang berupa minyak, dikarenakan enzim terjebak dalam air yang bersifat polar sulit untuk berinteraksi dengan minyak yang bersifat non polar.

Wardoyo pada tahun 2014 menggunakan kitosan serbuk sebagai padatan pendukung untuk imobilisasi enzim lipase. Metode yang digunakan adalah ikatan silang dengan glutaraldehid. Hasil dari penelitian tersebut, kitosan serbuk dengan derajat deasetilasi 81,34% dan pH pelarutan enzim 6 menunjukkan kondisi optimum, dengan jumlah enzim terimobilisasi sebanyak 47,67%.

Hasil optimum dari penelitian Wardoyo (2014) mengenai imobilisasi enzim tersebut masih perlu untuk diuji kestabilannya baik kestabilan termal maupun kestabilan penggunaan berulang, sehingga diharapkan dapat diperoleh biokatalis enzim lipase terimobilisasi yang stabil terhadap perubahan suhu dan dapat digunakan ulang dalam reaksi hidrolisis.

3. METODE

Alat

Seperangkat alat gelas (Pyrex), botol Falcon 50 mL, *magnetic stirrer*, penyaring Buchner, corong gelas, buret, mikropipet (10-200 μ L), timbangan digital (Shimadzu Libror EB-330), oven (WTB Binder), pH meter, almari es (*freezer*), desikator, Elisa reader, mikroplate, *Shaker Inkubator* (Seiwa RikoCo, Ltd, EFM-60).

Bahan

Minyak kelapa sawit (Bimoli spesial), cangkang kepiting, enzim lipase pankreas babi (Merck), kertas saing *Whatman* 41, kertas indikator pH, akuades, bahan dari Merck berkualitas p.a yaitu: BF₃ dalam metanol, n-heksana, etanol. Asam klorida (HCl), natrium monohidrogen fosfat (Na₂HPO₄.2H₂O), natrium dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄.H₂O), natrium hidroksida (NaOH), tembaga II sulfat (CuSO₄.5H₂O), kalium natrium tartrat (KNaC₄H₄O₆.4H₂O), indikator phenolphthalein, bovin serum albumin (BSA), dan glutaraldehid.

Pengukuran konsentrasi protein

Larutan standar dibuat dengan cara melarutkan Bovin Serum Albumin (BSA) dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing variasi konsentrasi larutan diambil 100 μ L dan ditambah dengan 160 μ L biuret lalu dibaca absorbansinya pada λ 550 nm menggunakan elisa reader. Sebagai blanko digunakan campuran 100 μ L akuades ditambah 160 μ L biuret. Hasil absorbansi larutan standar digunakan untuk membuat kurva baku (absorbansi vs konsentrasi).

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan cara 100 μ L larutan protein ditambah 160 μ L reagen biuret kemudian dianalisis dengan elisa reader. Konsentrasi protein sampel didapatkan dengan memasukkan data absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar.

Reaksi hidrolisis enzim lipase

Sebanyak 1 gram minyak kelapa sawit dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 10 μ L akuades lalu ditambah n-heksan hingga tanda batas. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam botol falcon 50 mL dan ditambahkan 150 mg enzim lipase bebas. Larutan diaduk dalam shaker inkubator

selama 5 jam pada suhu 37 °C. Untuk kontrol reaksi digunakan minyak kelapa sawit tanpa ditambah enzim lipase dengan prosedur yang sama. Hasil reaksi disaring lalu filtrat ditambah 10 mL etanol dan 2-3 tetes indikator pp. Aktivitas enzim lipase diukur melalui penentuan asam lemak bebas yang terbentuk menggunakan larutan NaOH 0,05 M. Perhitungan unit aktivitas dan aktivitas spesifik menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ FFA} = \frac{\text{BM minyak} \times \text{M NaOH} \times \text{volume NaOH}}{\text{berat minyak}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Unit Aktivitas (U)} = \frac{\text{volume NaOH} \times \text{M NaOH}}{\text{waktu reaksi}} \quad (2)$$

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{unit aktivitas}}{\text{berat enzim}} \quad (3)$$

Imobilisasi enzim lipase

Prosedur imobilisasi secara umum adalah dengan cara sebanyak satu gram kitosan serbuk dimasukkan dalam botol falcon 50 mL lalu ditambah dengan larutan glutaraldehid 0,75%. Campuran didiamkan selama 10 menit kemudian disaring.

Kitosan ini lalu ditambah dengan larutan enzim lipase 1% yang telah dilarutkan dalam buffer fosfat 0,05 M pH 6 dan didiamkan selama satu jam, kemudian disaring dan didapatkanlah enzim terimobilisasi pada kitosan serbuk serta sisa larutan enzim. Filtrat yang dihasilkan diukur kadar proteinnya dengan elisa reader. Jumlah enzim lipase terimobilisasi merupakan hasil pengurangan jumlah enzim awal dikurangi jumlah enzim sisa.

$$\% \text{ enzim terimobilisasi} = \frac{\text{jumlah enzim terimobilisasi (mg)}}{\text{jumlah enzim awal (mg)}} \times 100\% \quad (4)$$

Uji stabilitas termal enzim lipase terimobilisasi

Uji stabilitas termal dilakukan dengan menggunakan enzim lipase terimobilisasi pada kitosan serbuk dan enzim lipase bebas dalam reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit. Sebelumnya enzim lipase terimobilisasi pada kitosan serbuk dan enzim lipase bebas dipanaskan terlebih dahulu pada variasi temperatur 35, 40, 45, dan 50°C selama 20 menit. Kemudian diuji aktivitasnya dalam reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit.

Uji penggunaan ulang enzim lipase

Uji penggunaan ulang dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak enzim lipase terimobilisasi dapat digunakan untuk reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit. Pada uji penggunaan ulang, enzim lipase terimobilisasi pada kitosan serbuk dipisahkan dari substrat setelah selesai reaksi dan digunakan kembali dalam reaksi selanjutnya dengan prosedur yang sama. Sebagai kontrol digunakan enzim lipase bebas.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Stabilitas termal enzim lipase terimobilisasi

Uji kestabilan termal enzim lipase bertujuan untuk mengetahui bagaimana pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim lipase dalam menghidrolisis minyak kelapa sawit. Laju reaksi akan meningkat seiring dengan adanya kenaikan temperatur sampai pada batas optimalnya, karena enzim akan terdeaktivasi pada temperatur yang terlalu tinggi (Nelson, 2004).

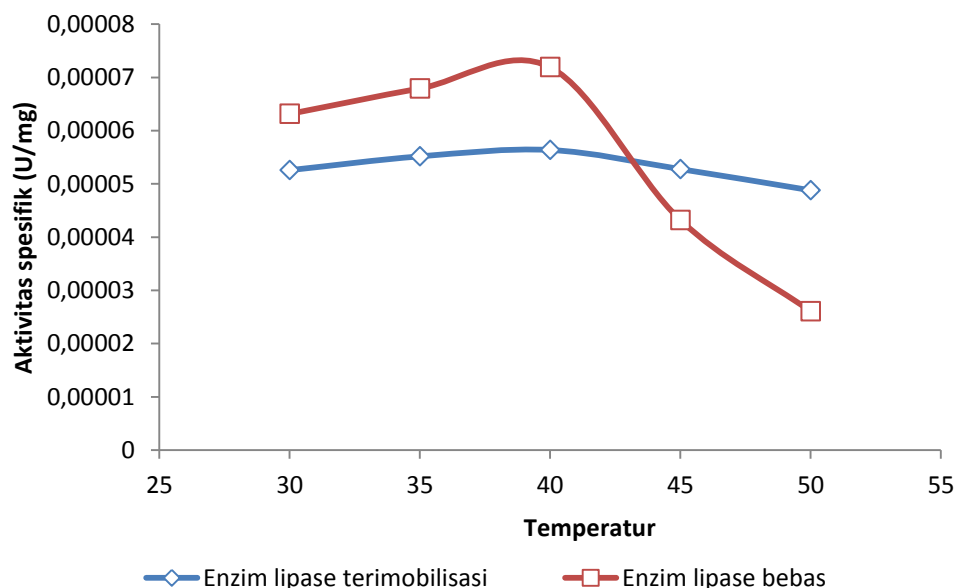
Tahap awal uji stabilitas termal enzim lipase dilakukan dengan proses pemanasan pada enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi dengan variasi temperatur kemudian dilihat pengaruhnya terhadap aktivitas hidrolisisnya.

Padatan pendukung yang digunakan dalam uji stabilitas termal adalah kitosan dengan derajat deasetilasi 81,34%. Variasi temperatur yang dilakukan yaitu pada temperatur normal (tanpa pemanasan terlebih dahulu), 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C.

Sebagai perbandingan digunakan reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit tanpa menggunakan enzim lipase dan dihasilkan asam lemak bebas sebanyak 1,38%. Untuk hasil uji stabilitas termal enzim lipase disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kestabilan termal enzim lipase pada reaksi hidrolisis

Temperatur	FFA enzim lipase bebas (%)	FFA enzim lipase terimobilisasi (%)
normal	62,82	52,32
35 °C	67,58	54,89
40 °C	71,53	56,08
45 °C	43,00	52,51
50 °C	25,95	48,55



Gambar 1. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim

Dari Tabel 1 terlihat bahwa pada variasi enzim lipase bebas tanpa pemanasan terlebih dahulu, jumlah asam lemak bebas (FFA) yang terbentuk sebanyak 62,82% dan terus meningkat sampai pada variasi pemanasan 40 °C yang menghasilkan FFA sebanyak 71,53%.

Kecenderungan yang sama juga ditunjukkan pada enzim lipase terimobilisasi, dimana pada variasi tanpa pemanasan dihasilkan FFA sebanyak 52,32% dan meningkat menjadi 56,08% pada variasi pemanasan 40 °C. Hal ini dikarenakan pada temperatur dibawah 35 °C masih dibawah temperatur optimum enzim, dimana konformasi enzim masih belum siap untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit, sehingga enzim masih harus menyesuaikan konformasi terlebih dahulu dan jumlah FFA yang dihasilkan menjadi sedikit.

Pada saat pemanasan 35 °C konformasi enzim lipase telah siap untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit karena mendekati temperatur optimum

enzim. Ketika direaksikan pada temperatur 40 °C enzim dapat bekerja secara optimum, ditandai dengan aktivitas spesifiknya yang meningkat dan juga FFA yang dihasilkan meningkat. Pada saat pemanasan diatas 45 °C, aktivitas spesifik enzim mengalami penurunan demikian pula jumlah FFA yang dihasilkan baik oleh enzim lipase bebas maupun enzim lipase terimobilisasi lebih sedikit dibandingkan dengan pemanasan pada temperatur 40 °C. Hal ini kemungkinan disebabkan konformasi enzim akan rusak diatas temperatur optimumnya sehingga aktivitas spesifiknya menurun sehingga FFA yang terbentuk menjadi lebih sedikit.

Pada pemanasan 50 °C aktivitas spesifik enzim lipase bebas dan enzim lipase terimobilisasi semakin menurun sehingga FFA yang dihasilkan juga menjadi semakin menurun karena semakin banyak enzim yang terdeaktivasi pada temperatur tinggi. Pada temperatur 50 °C ini jumlah FFA yang dihasilkan oleh enzim lipase bebas sudah menurun drastis apabila dibandingkan dengan enzim lipase terimobilisasi.

Dari sejumlah data tersebut menunjukkan bahwa enzim lipase terimobilisasi dapat lebih mempertahankan aktivitas spesifiknya pada temperatur tinggi apabila dibandingkan dengan enzim lipase bebas. Hal ini sesuai dengan penelitian Febrina (2012) yang menyatakan bahwa enzim lipase terimobilisasi cenderung lebih stabil terhadap perubahan temperatur pemanasan. Adanya padatan pendukung dapat melindungi enzim dari denaturasi karena panas, sehingga enzim masih dapat mempertahankan aktivitasnya.

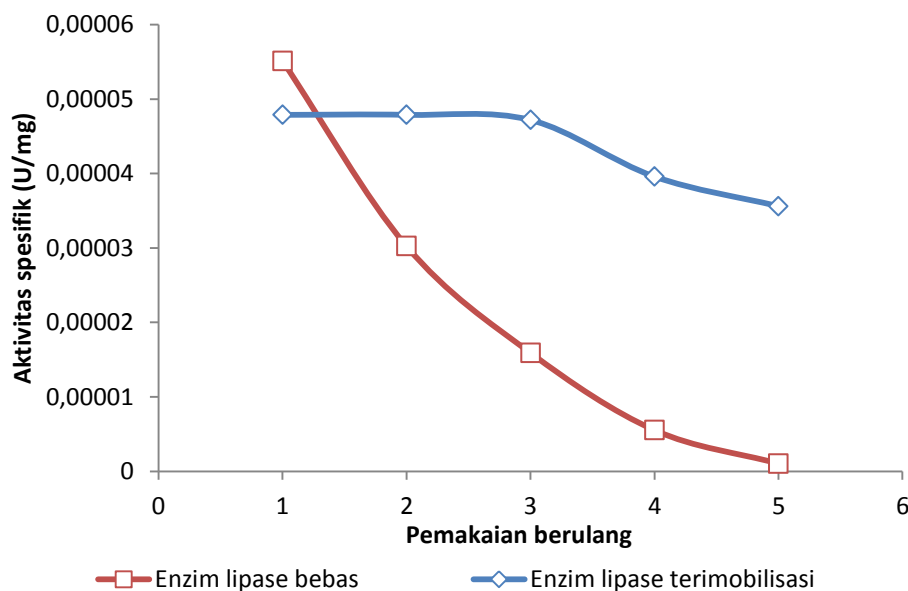
Stabilitas penggunaan ulang

Salah satu tujuan dari imobilisasi enzim adalah untuk mengetahui apakah enzim terimobilisasi dapat digunakan kembali setelah digunakan dalam suatu reaksi. Semakin tinggi tingkat penggunaan berulang berarti metode imobilisasi yang digunakan tersebut semakin baik.

Pada penelitian ini diketahui bahwa enzim lipase terimobilisasi masih dapat digunakan hingga lima kali siklus reaksi. Hasil stabilitas penggunaan ulang enzim lipase melalui reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 2.

Tabel 2. Kestabilan penggunaan berulang enzim lipase pada reaksi hidrolisis

Penggunaan	FFA enzim lipase bebas (%)	FFA enzim lipase terimobilisasi (%)
1	63,21	54,89
2	34,68	54,89
3	18,23	54,09
4	6,34	45,38
5	1,18	40,82



Gambar 2. Hubungan pemakaian berulang terhadap aktivitas enzim

Dari Gambar 2, terlihat bahwa enzim lipase bebas mengalami penurunan aktivitas spesifik yang sangat drastis pada pemakaian kedua. Hal ini dikarenakan enzim lipase bebas telah rusak dikarenakan kontaminasi substrat terhadap enzim, dapat pula disebabkan karena enzim susah terpisah dari produk sehingga konsentrasi enzim yang bereaksi pada pemakaian selanjutnya sudah jauh berkurang. Pada penggunaan kelima, asam lemak bebas

yang terbentuk hanya 1,18%. Hasil ini lebih kecil jika dibandingkan dengan reaksi hidrolisis tanpa menggunakan enzim yang menghasilkan asam lemak bebas sebesar 1,38%. Hal ini mungkin dikarenakan penyimpanan minyak yang terlalu lama juga dapat mempengaruhi asam lemak yang dikandungnya.

Enzim lipase terimobilisasi menunjukkan hasil lebih baik dalam hal penggunaan ulang jika dibandingkan

dengan enzim lipase bebas. Enzim lipase bebas masih dapat mempertahankan aktivitas spesifiknya setelah digunakan sebanyak lima kali siklus reaksi, meskipun aktivitas spesifiknya sedikit menurun. Hasil yang diperoleh ini sesuai dengan yang diharapkan, bahwa enzim lipase terimobilisasi dapat digunakan kembali meskipun dengan aktivitas yang menurun.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa stabilitas termal enzim lipase terimobilisasi lebih baik jika dibandingkan dengan enzim lipase bebas. Ditandai dengan enzim lipase terimobilisasi masih dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya dengan baik hingga temperatur 50 °C.

Enzim lipase terimobilisasi juga mempunyai stabilitas penggunaan berulang yang jauh lebih baik dibanding enzim lipase bebas, dimana enzim lipase terimobilisasi masih dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya hingga lima kali siklus reaksi.

Saran

Dalam penelitian ini masih banyak hal-hal yang perlu dikembangkan, antara lain perlu dilakukan, antara lain uji stabilitas termal pada suhu diatas 50 °C dan juga uji penggunaan ulang lebih dari lima kali siklus reaksi, sehingga dapat dihasilkan biokatalis dengan aktivitas yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

Balcao, V. M., Paiva, A. L., dan Malcanta, F. X., 1996, Bioreactors With Immobilized Lipases: State of the Art, *Enz. Microb. Technology*, 18, 392-416
Brena, B.M., dan Batista-Viera, F., 2006, *Immobilization of Enzymes*, 1th edition, Humana Press, Totowa.

Cahyaningrum Sari Edi, 2009, Peranan Jembatan Kation Logam Dalam Imobilisasi Papain Pada Kitosan, *Disertasi*, Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta.
Febriana Lizma, 2012, Pengaruh Derajat Deasetilasi Terhadap Efektivitas Chitosan Bead Sebagai Padatan Pendukung Imobilisasi Lipase Dengan Teknik Pengaitan Silang, *Tesis*, Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta.
Krajewska, B., 2004, Application of Chitin and Chitosan based Materials for Enzyme Immobilizations: a Review, *Enz Microb. Technol.*, 35, 126-139
Nelson, D.L., 2004, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edition, W. H. publisher, New York.
Primadevi, Susan, 2013, Imobilisasi Lipase Pada Chitosan Bead dengan Teknik Pengikatan Silang: Pengaruh pH dan Konsentrasi Kitosan Terhadap Aktivitas Transesterase, *Tesis*, Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta
Smith A.L., 1997, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press.
Stryer, Lubert. 1988. *Biochemistry*, Third Edition, W.H.Freeman and Company, New York.
Wardoyo, Fandhi A., 2014, Pengaruh Derajat Deasetilasi Kitosan dan pH Pelarutan Enzim Terhadap Kemampuan Imobilisasi Lipase pada Kitosan Serbuk, *Prosiding Seminar Nasional Hasil-hasil Penelitian & Pengabdian*, 09 Agustus 2014, Semarang.
Wulan, P., Rejoso, M.T., dan Hermansayh, H., 2009, *Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase Rhizoma oryzae yang di Imobilisasi Melalui Metode Adsorpsi*, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.